



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107643407 A

(43)申请公布日 2018.01.30

(21)申请号 201710835967.5

(22)申请日 2017.09.16

(71)申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 何方洋 万宇平 郑迎春 吴小胜
彭庆军 张瑜 赵颖 蒋金峰
李鸿英

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

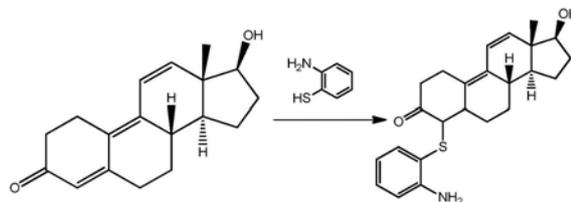
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

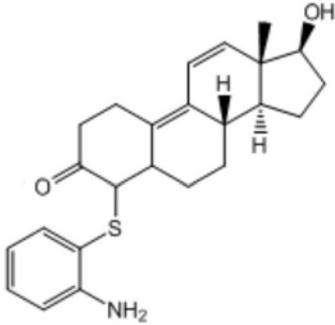
一种群勃龙的磁免疫化学发光检测试剂盒
及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种群勃龙的磁免疫化学发光检测试剂盒,它包括:酶标抗原、酶标抗原稀释液、磁标抗体、磁标抗体稀释液、群勃龙系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、复溶液、洗涤液,其中酶标抗原是辣根过氧化物酶标记的群勃龙半抗原,磁标抗体是免疫磁珠标记的群勃龙单克隆抗体。本发明还公开了一种利用上述试剂盒配套化学发光检测仪检测动物组织、饲料、尿液中群勃龙残留量的方法,本方法对群勃龙检测具有较高的灵敏度、特异性和较短的检测时间。



1. 一种群勃龙的磁免疫化学发光检测试剂盒,包括酶标抗原、酶标抗原稀释液、磁标抗体、磁标抗体稀释液、群勃龙系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、复溶液、洗涤液;其特征在于:所述酶标抗原是辣根过氧化物酶标记的群勃龙半抗原,所述磁标抗体是免疫磁珠标记的群勃龙单克隆抗体,所述群勃龙单克隆抗体是由群勃龙半抗原与人血清白蛋白偶联得到的偶联物作为免疫原免疫动物制备获得;所述群勃龙半抗原是由群勃龙与2-氨基苯硫醇反应得到,其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述免疫磁珠表面含有一OH、—COOH或—NH₂活性基团。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述化学发光底物A液为含有鲁米诺和对甲苯酚的三羟甲基氨基甲烷溶液,化学发光底物B液为含有柠檬酸、无水Na₂HP0₄和CO(NH₂)₂·H₂O₂的水溶液。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒配套化学发光检测仪检测群勃龙的残留量。

5. 一种利用权利要求1-4任一项所述的试剂盒检测群勃龙的方法,包括下列步骤:

1) 将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:10~1:20的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中;

2) 将磁标抗体与磁标抗体稀释液按照1:10~1:20的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪磁标抗体工作液容器中;

3) 化学发光检测仪分别吸取30~60μL酶标抗原工作液、30~60μL待测样品液和30~60μL磁标抗体工作液,依次加入到反应杯存储装置中,室温下反应15min,再通过清洗装置进行磁分离2~4min,弃上清液后用洗涤液300~500μL对复合物沉淀清洗3~5次;

4) 将分离好的复合物放入测量暗箱,加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各50μL,检测发出的相对光强度,样品中群勃龙的含量与相对光强度成负相关关系,通过相对光强度标准曲线计算群勃龙的残留量。

一种群勃龙的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种化学发光检测试剂盒及其检测方法,特别是检测动物组织、饲料、尿液等样品中群勃龙残留量的磁免疫化学发光检测试剂盒,属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 群勃龙(Trenbolone, TRE)是一种应用广泛的甾类蛋白同化激素,它是在结构及活性上与人体雄性激素睾酮相似的化学合成衍生物。它能促进蛋白质合成、增进食欲、增长肌肉、促进钙磷在骨组织中沉着,临床上可用于治疗严重的营养缺乏和骨质疏松症等疾病,但它同时也是使用频率最高的一类运动兴奋剂。此外,在畜牧生产上,群勃龙在对动物疾病控制和治疗上起到重要的作用。但是需要注意的是,群勃龙有严重的副作用,比如可以引起失眠症、高血压、夜间盗汗等症状。基于以上缺点,在许多国家和地区群勃龙的使用都被严格控制。但是受到利益的驱使,群勃龙仍然被非法使用,所以开发一个简便、快速、灵敏的用于检测动物组织、饲料、尿液中的群勃龙残留的方法就显得极为重要。

[0003] 目前,群勃龙的药物残留检测方法主要包括理化方法和免疫分析法等。理化方法有HPLC、GC-MS、LC、LC-MS等,此类方法稳定、准确,可以作为标准方法,但是仪器设备昂贵、笨重,样品前处理复杂,不适合大规模样品的即时检测。免疫分析法是以抗原、抗体的特异性反应为基本原理建立起来的快速分析方法,由于抗原、抗体的结合具有高选择性和灵敏性,使得这一技术在药物残留检测领域得到广泛的应用。目前,最常用的免疫检测方法包括酶联免疫检测法和胶体金免疫层析检测法,但由于灵敏度较低,假阴性率和假阳性率较高,逐渐被灵敏度高、准确度高、检测时间短的化学发光免疫检测方法所替代。磁免疫化学发光检测试剂配套磁免疫化学发光检测仪检测动物组织、饲料、尿液中群勃龙的残留,实现检测过程的全自动化,减少人为操作误差,灵敏度高,准确度高,检测成本低,适用于大批量样品中群勃龙残留量的筛查。

发明内容

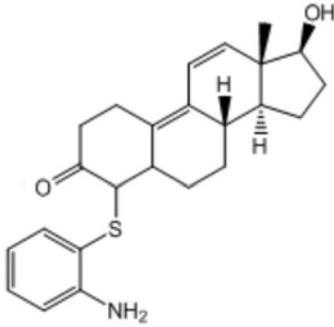
[0004] 本发明的目的在于提供一种群勃龙检测试剂盒,采用该试剂盒进行群勃龙残留量检测时,具有较高的灵敏度、特异性和准确度。

[0005] 本发明的另一个目的在于提供一种检测群勃龙的方法,采用试剂盒配套化学发光检测仪进行群勃龙残留量检测时,不仅具有较高的灵敏度、特异性和准确度,而且实现了全自动化检测,缩短检测时间,减少人为操作误差。

[0006] 本发明试剂盒,它包括:酶标抗原、酶标抗原稀释液、磁标抗体、磁标抗体稀释液、群勃龙系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、复溶液、洗涤液。

[0007] 所述酶标抗原是辣根过氧化物酶标记的群勃龙半抗原,所述磁标抗体是免疫磁珠标记的群勃龙单克隆抗体,所述群勃龙单克隆抗体是由群勃龙半抗原与人血清白蛋白偶联得到的偶联物作为免疫原免疫动物制备获得;所述群勃龙半抗原是由群勃龙与2-氨基苯硫醇反应得到,其分子结构式为:

[0008]



[0009] 所述免疫磁珠表面含有一OH、—COOH或—NH₂活性基团。

[0010] 所述化学发光底物A液为含有鲁米诺和对甲苯酚的三羟甲基氨基甲烷溶液,化学发光底物B液为含有柠檬酸、无水Na₂HPO₄和CO(NH₂)₂·H₂O₂的水溶液。

[0011] 所述群勃龙系列标准品溶液浓度分别为0μg/L、0.05μg/L、0.15μg/L、0.45μg/L、1.35μg/L、4.05μg/L。

[0012] 所述酶标抗原稀释液是pH 7.2~7.6、Na₃PO₄浓度为0.01mol/L、NaCl浓度为0.25mol/L的缓冲溶液。

[0013] 所述磁标抗体稀释液是pH 7.2~7.6、Na₃PO₄浓度为0.01mol/L、NaCl浓度为0.25mol/L的缓冲溶液。

[0014] 所述复溶液是pH 7.0、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0015] 所述洗涤液是pH 7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01‰~0.03‰叠氮化钠、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0016] 所述试剂盒配套化学发光检测仪检测动物组织、饲料、尿液样品中群勃龙的残留量。

[0017] 本发明还提供一种利用上述试剂盒配套化学发光检测仪检测群勃龙残留量的方法,包括下列步骤:

[0018] 1) 将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:10~1:20的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中;

[0019] 2) 将磁标抗体与磁标抗体稀释液按照1:10~1:20的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪磁标抗体工作液容器中;

[0020] 3) 化学发光检测仪分别吸取30~60μL酶标抗原工作液、30~60μL待测样品液和30~60μL磁标抗体工作液,依次加入到反应杯存储装置中,室温下反应15min,再通过清洗装置进行磁分离2~4min,弃上清液后用洗涤液300~500μL对复合物沉淀清洗3~5次;

[0021] 4) 将分离好的复合物放入测量暗箱,加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各50μL,检测发出的相对光强度,样品中群勃龙的含量与相对光强度成负相关关系,通过相对光强度标准曲线计算群勃龙的残留量。

[0022] 本发明中分析测试方法所用的化学发光检测仪包括电源电路、反应杯存储装置、样品存储装置、样品臂、试剂存储装置、试剂臂、运动式冷藏装置、清洗装置、自动注射泵、微光检测器,同时还配置有计算机与中文界面的Windows控制软件,可进行资料录入、结果汇总、质量控制、结果存储和结果查询等功能,可完成多种分析模式的编程,定量或定性报告结果,自动生成并储存和更新功能,两点自动修正标准曲线。

[0023] 本发明的有益效果如下：

[0024] 1) 本发明试剂盒具有较高的灵敏度和特异性，对群勃龙的检测灵敏度可达到0.05 $\mu\text{g/L}$ 。

[0025] 2) 本发明试剂盒配套化学发光检测仪对样品中群勃龙残留量进行检测，实现检测过程的全自动化，减少人为操作误差，检测时间短，仅需20min即可完成对样品中群勃龙残留量的检测。

附图说明

[0026] 图1:群勃龙半抗原合成路线图

[0027] 图2:磁免疫化学发光检测试剂盒标准曲线图

具体实施方式

[0028] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明，而不用来限制本发明的范围。

[0029] 实施例1:群勃龙磁免疫化学发光检测试剂盒具体组分的制备

[0030] 1. 群勃龙半抗原的合成(合成路线见附图1)及鉴定

[0031] 取无水乙醇20mL，加金属钠0.2g，溶解，氮气保护下，加群勃龙1.0g，充分搅拌后，加0.46g 2-氨基苯硫醇，充分溶解后，反应2h，加适量冷水，乙酸乙酯萃取，蒸干，上硅胶柱，石油醚/乙酸乙酯(v/v, 2/1)洗脱分离，得到氨基化群勃龙半抗原产物1.2g，收率82.02%。

[0032] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定， $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ : 7.14 (1H, s, ArH), 6.96 (1H, dd, ArH), 6.71 (1H, dd, ArH), 6.53 (1H, dd, ArH), 6.27 (1H, dd, NH_2), 5.97 (1H, dd, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.47 (1H, s, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.58 (1H, s, OH), 3.42 (1H, s, NH), 3.26 (1H, s, CH), 2.44–2.54 (4H, ddd, CH_2), 2.29 (2H, d, CH_2), 1.35–1.79 (8H, d, CH), 1.30 (3H, s, CH_3)。其中，化学位移 δ 为7.14、6.96、6.71、6.53的是间隔臂苯环上氢的吸收峰，6.27为氨基吸收峰，这些峰的存在，证明间隔臂偶联成功。

[0033] 2. 酶标抗原的制备

[0034] 取群勃龙半抗原12mg，加0.2mL乙醇溶解，加7.5%的戊二醛溶液0.5mL，室温搅拌2h，得到A液；取辣根过氧化物酶(HRP) 100mg，加碳酸盐缓冲液溶解，得到B液，将A液滴加到B液中，4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜，0.02mol/L PB缓冲液透析3天，每天换液3次，得到酶标抗原，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，备用。

[0035] 3. 免疫原的制备

[0036] 取群勃龙半抗原17mg，加0.5mL乙醇溶解，加1mol/L的稀盐酸0.13mL，低温搅拌；取4mg亚硝酸钠，加水溶解，滴加到半抗原溶液中，低温搅拌1h，得到A液；取人血清白蛋白(HSA) 100mg，加碳酸钠缓冲液溶解，冰浴到0–5 $^{\circ}\text{C}$ ，在搅拌下滴加A液，继续反应2h，0.02mol/L PB缓冲液透析3天，每天换液3次，得到免疫原，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，备用。

[0037] 4. 群勃龙单克隆抗体的制备

[0038] (1) 杂交瘤细胞的获得

[0039] 1) 首次免疫:将群勃龙半抗原-HSA偶联物(免疫原)与等量的弗氏完全佐剂充分乳化，皮下注射6周龄的Balb/c小鼠，每只0.2mL；

[0040] 2) 加强免疫两次:从首次免疫开始,每两周加强免疫一次,用弗式不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

[0041] 3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1mL,三天后处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

[0042] 4) 采用间接酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌群勃龙单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0043] (2) 单克隆抗体的制备

[0044] 1) 细胞复苏:取出群勃龙单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

[0045] 2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存。

[0046] 5. 磁标抗体的制备

[0047] 该过程以粒径2.8 μ m的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有反应活性的羧基基团,在经活化剂EDC-NHS组合处理后,活化磁珠可与群勃龙单克隆抗体进行偶联,具体步骤如下:

[0048] (1) 清洗:取100 μ L羧基磁珠(购于DYNAL,粒径为2.8 μ m,含量是0.15eq/g)于离心管中,用100 μ L含0.05%吐温-20的pH5.0、25mmol/L的MES溶液洗涤2次,磁分离后移除上清;

[0049] (2) 活化:用4℃贮存的pH5.0、25mmol/L MES溶液分别配制50mmol/L的EDC、NHS溶液;分别加入50 μ L新配制的EDC和NHS溶液到装有磁珠的离心管中,涡旋混匀,室温活化30min,磁分离后移除上清,同(1)MES溶液洗涤2-3次;

[0050] (3) 偶联:将群勃龙单克隆抗体溶解到60 μ L pH5.0、25mmol/L MES溶液中,用所述MES溶液调节总体积至100 μ L,轻柔加入到已活化磁珠中,室温偶联30min或4℃偶联2h,期间使磁珠保持混匀状态;

[0051] (4) 封闭:磁分离后移除上清,加入100 μ L pH7.4的TRIS溶液反应15min封闭磁珠;

[0052] (5) 保存:磁分离后移除上清,用100 μ L含0.1%-0.3%BSA、0.1%吐温-20的TRIS溶液洗涤封闭好的磁珠3-5次,磁分离后移除上清,将磁珠复溶于含0.1%-0.5%BSA、0.01%-0.1%吐温-20、0.02%NaN₃的TRIS溶液中(浓度为10mg/mL),2-8℃保存备用。

[0053] 实施例2:群勃龙磁免疫化学发光检测试剂盒的组建

[0054] 组建群勃龙磁免疫化学发光检测试剂盒,使其包含下述组分:

[0055] (1) 辣根过氧化物酶标记的群勃龙半抗原;

[0056] (2) 酶标抗原稀释液为pH 7.2~7.6、Na₃PO₄浓度为0.01mol/L、NaCl浓度为0.25mol/L的缓冲溶液;

[0057] (3) 免疫磁珠标记的群勃龙单克隆抗体;

[0058] (4) 磁标抗体稀释液为pH 7.2~7.6、Na₃PO₄浓度为0.01mol/L、NaCl浓度为0.25mol/L的缓冲溶液;

[0059] (5) 群勃龙系列标准品溶液,浓度分别为0 μ g/L、0.05 μ g/L、0.15 μ g/L、0.45 μ g/L、

1.35 μ g/L、4.05 μ g/L;

[0060] (6) 化学发光底物A液为含有鲁米诺和对甲苯酚的三羟甲基氨基甲烷溶液,化学发光底物B液为含有柠檬酸、无水Na₂HPO₄和CO(NH₂)₂·H₂O₂的水溶液;

[0061] (7) 复溶液为pH 7.0、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液;

[0062] (8) 洗涤液为pH 7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0063] 实施例3:样品中群勃龙残留量的检测

[0064] 1. 样品前处理

[0065] (1) 动物组织(鸡肉/肝、猪肉/肝、鱼、虾)、饲料样品:用均质器均质组织、饲料样品;称取2.0g \pm 0.05g均质物至50mL聚苯乙烯离心管中,加入10mL乙腈-0.1mol/L氢氧化钠溶液(量取80mL乙腈和20mL 0.1mol/L氢氧化钠溶液混合均匀),用振荡器振荡10min,3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}$ C)离心10min;移取0.5mL上清液至离心管中,加入0.5mL 0.1mol/L氢氧化钠溶液,振荡后加入5mL三氯甲烷,用涡旋仪涡动2min,3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}$ C)离心10min(如果样品出现乳化现象,需在70 $^{\circ}$ C水浴2-4min,再次离心直至下层清亮为止);除去上层,取1mL下层清亮有机相至10mL干净的玻璃试管中,于50~60 $^{\circ}$ C水浴氮气流下吹干;用1mL复溶液溶解干燥的残留物;取50 μ L水相用于分析。

[0066] (2) 尿液样品:取2mL尿液到离心管中,将尿液于3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}$ C)离心5min,直至尿液样品清亮;移取1mL清亮尿液样品至50mL聚苯乙烯离心管中,加入10 μ L Glucuronidase/Arylsulfatase(葡糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶),在37 $^{\circ}$ C水解2h,加入5mL三氯甲烷,用振荡器振荡5min,3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}$ C)离心10min;去除上层,取1mL下层清亮有机相至10mL干燥的玻璃试管中,于50~60 $^{\circ}$ C氮气流下吹干;用1mL复溶液溶解干燥的残留物;取50 μ L水相用于分析。

[0067] 2. 用试剂盒检测

[0068] 将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:10~1:20的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中;将磁标抗体与磁标抗体稀释液按照1:10~1:20的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪磁标抗体工作液容器中;对每个样品/标准品设置样品架上的位置,输入样品信息和需要检测的测试项目名称;将样品管/标准品管放入已设定好的样品架上,化学发光检测仪依次吸取50 μ L酶标抗原工作液、50 μ L待测样品/标准品和50 μ L磁标抗体工作液加入到反应杯存储装置中,混匀,室温下反应15min,再通过清洗装置进行磁分离4min,弃上清液后用洗涤液对复合物沉淀清洗3~5次,再加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各50 μ L,检测其发出的相对光强度(RLU),样品中群勃龙的含量与RLU成负相关关系,可以通过RLU结合标准曲线法计算群勃龙的残留量。

[0069] 3. 检测结果分析

[0070] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的RLU平均值(RLU)除以第一个标准品溶液(0标准)的RLU值(RLU₀)再乘以100%,得到相对发光强度(%).以群勃龙标准品浓度(μ g/L)的对数值为横坐标,相对发光强度为纵坐标,绘制标准曲线,如图2所示.用同样的办法计算样品溶液的相对发光强度,相对应每一个样品的群勃龙含量则可从标准曲线上读出。

[0071] 实施例4:群勃龙磁免疫化学发光检测试剂盒的质量评价

[0072] 1. 检测限

[0073] 对空白猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼、虾、饲料、尿液样品各20份进行检测,从标准曲线上查出对应于各相对发光强度的浓度,以20份样品浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果得该方法对动物组织、饲料样品的检测限为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对尿液样品的检测限为0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0074] 2. 样品精密度和准确度试验

[0075] 以回收率作为准确度评价指标,以重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%) = 实际测定值/理论值 $\times 100\%$,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差RSD% = SD/X $\times 100\%$,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0076] 按2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度群勃龙对空白猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼、虾、饲料样品进行添加回收测定,0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 三个浓度群勃龙对空白尿液样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂盒进行测定,计算样品平均回收率及精密度,结果见表1。

[0077] 表1 精密度及准确度试验

样品	添加浓度[$\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$]	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
猪肉	2.5	84.3	5.6	7.8
	5.0	96.1	7.1	9.0
	10.0	90.7	6.9	7.5
猪肝	2.5	91.5	7.3	9.1
	5.0	86.2	8.2	9.3
	10.0	80.9	6.8	8.4
鸡肉	2.5	85.4	6.1	7.8
	5.0	89.6	5.5	9.0
	10.0	95.0	8.0	8.5
鸡肝	2.5	90.8	7.7	7.9
	5.0	82.5	9.1	9.5
	10.0	93.4	8.5	9.0
鱼	2.5	88.1	6.3	8.4

[0078]

[0079]		5.0	91.4	7.0	7.9
		10.0	84.0	7.8	8.1
	虾	2.5	95.3	5.9	6.7
		5.0	91.8	7.3	8.2
		10.0	87.2	7.1	7.8
	饲料	2.5	86.9	6.6	8.1
		5.0	81.4	8.0	9.0
		10.0	92.7	8.2	8.8
	尿液	0.25	75.9	7.3	8.1
		0.50	88.1	5.8	6.7
		1.00	82.6	7.7	7.9

[0080] 以2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度的群勃龙对空白猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼、虾、饲料样品进行添加,平均回收率在80%~100%;以0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 三个浓度的群勃龙对空白尿液样品进行添加,平均回收率在70%~90%;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0081] 3. 特异性试验

[0082] 选择与群勃龙具有类似结构和类似功能的药物进行测定,通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度,用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率,结果见表2。

[0083] 交叉反应率 (%) = $\frac{\text{引起 50\%抑制的群勃龙浓度}}{\text{引起 50\%抑制的群勃龙类似物浓度}} \times 100\%$

[0084] 表2交叉反应率试验

[0085]

药物名称	IC ₅₀	交叉反应率 (%)
群勃龙	0.143	100
去氢甲睾酮	—	<1
睾酮	—	<1
大力补	—	<1
19-去甲睾酮	3.178	4.5

[0086] 注:IC₅₀为“—”是因为曲线扭曲变形,无法用于计算得出具体数值。

[0087] 4. 稳定性试验

[0088] 试剂盒保存条件为2~8 $^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大RLU值(零标准)、50%抑制浓度、群勃龙添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存12个月以上。

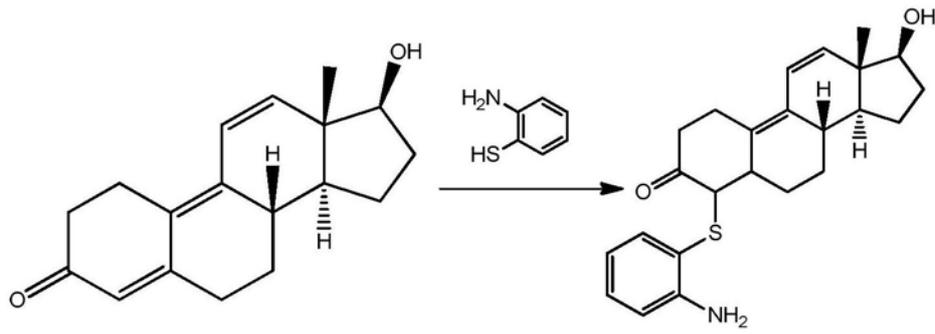


图1

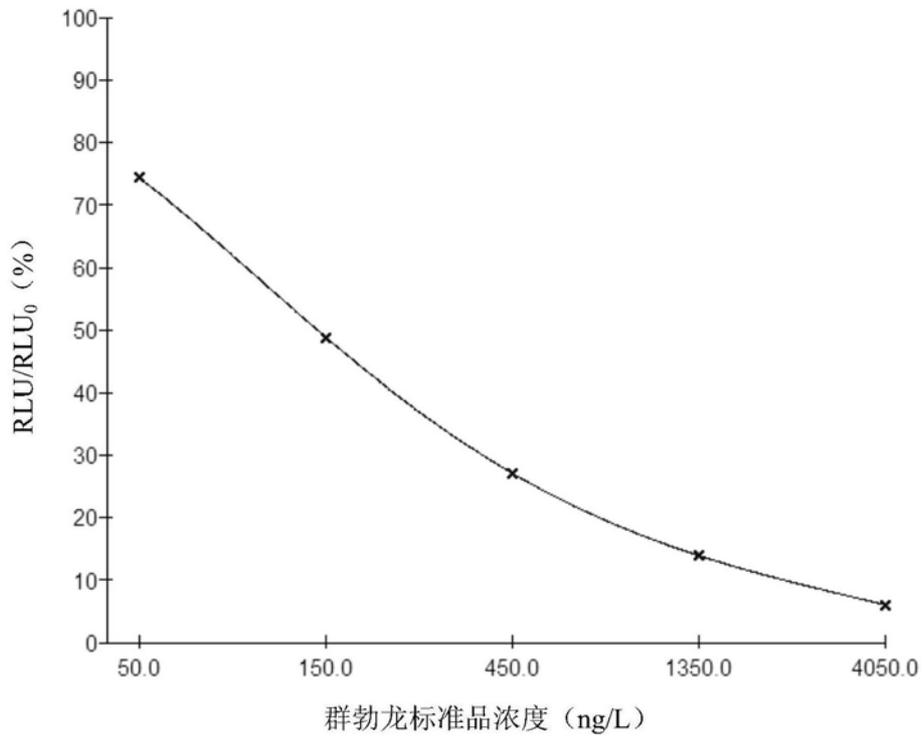


图2

专利名称(译)	一种群勃龙的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN107643407A	公开(公告)日	2018-01-30
申请号	CN2017110835967.5	申请日	2017-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 郑迎春 吴小胜 彭庆军 张瑜 赵颖 蒋金峰 李鸿英		
发明人	何方洋 万宇平 郑迎春 吴小胜 彭庆军 张瑜 赵颖 蒋金峰 李鸿英		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/535 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种群勃龙的磁免疫化学发光检测试剂盒，它包括：酶标抗原、酶标抗原稀释液、磁标抗体、磁标抗体稀释液、群勃龙系列标准品溶液、化学发光底物A液、化学发光底物B液、复溶液、洗涤液，其中酶标抗原是辣根过氧化物酶标记的群勃龙半抗原，磁标抗体是免疫磁珠标记的群勃龙单克隆抗体。本发明还公开了一种利用上述试剂盒配套化学发光检测仪检测动物组织、饲料、尿液中群勃龙残留量的方法，本方法对群勃龙检测具有较高的灵敏度、特异性和较短的检测时间。

